第25卷 第3期　　昆 虫 学 报　　Vol. 25, No. 3
1982年8月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Aug., 1982

昆虫肠道蛋白酶对苏芸金杆菌晶体作用的比较

沙槎云　白成
(中国科学院动物研究所)

摘要 本文以粘虫 *Leucania separata* Walker，棉铃虫 *Heliothis armigera* Hübner 大蜡螟 *Galleria mellonella* Linnaeus 和黄地老虎 *Agrotis segetum* Schiffermüller 4 种幼虫的肠道蛋白酶作用于苏芸金杆菌7404肯尼亚变种 (*B. t.* var. *kenyae*)、HD-1 戈尔斯德变种 (*B. t.* var. *kurstaki*) 7216天门变种 (*B. t.* var. *tianmensis*)、75023 (变种未定)、007苏芸金变种 (*B. t.* var. *thuringiensis*)、006玉米螟变种 (*B. t.* var. *ostriniae*)、7417松蠋变种 (*B. t.* var. *dendrolimus*) 及1897以色列变种 (*B. t.* var. *israelensis*) 的晶体，比较了其消化产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱。对粘虫肠道蛋白酶消化的晶体形态进行了电镜观察，并对晶体消化过程中光密度的变化作了测定。非病原菌的晶体亦能被肠液中的蛋白酶消化。

苏芸金杆菌 *Bacillus thuringiensis* 晶体对敏感寄主的作用方式已有许多报道 (Angus 1956, Lecadet 和 Martouret 1962, Cooksey 1968及其他)，认为完整的晶体无毒性，它的作用机制与寄主肠道的碱性 pH 和蛋白酶有密切关系，晶体在肠道中被蛋白酶水解释放出具活性的碎片。Faust 等 (1967) 报道了苏芸金杆菌 *pacifcus* 变种 (即 *aizawai* 鲇泽变种)的晶体被家蚕 *Bombyx mori* 肠道分泌物作用的详细观察。Murphy (1974) 报道了苏芸金杆菌苏芸金变种的晶体被3种夜蛾科幼虫(粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*、美洲棉铃虫 *Heliothis* Zea 和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*) 的肠道蛋白酶消化的研究。上述报道涉及苏芸金杆菌的敏感寄主，在非敏感寄主的肠道内，蛋白酶对晶体的作用则未见报道。

本文以4种鳞翅目幼虫肠道蛋白酶分别作用于苏芸金杆菌6个血清型8个变种的晶体。试图了解不同寄主肠道蛋白酶对晶体的作用方式、晶体能否被消化、消化速度以及与毒性的关系，从而进一步认识晶体的致病特性。

材 料 与 方 法

1. 菌株及来源见表1。

纯晶体与纯芽孢的提取参照 Pendleton (1967) 和王瑛等 (1980) 的方法，纯度可达99%以上。

2. 试虫　粘虫用玉米叶在28℃饲养，棉铃虫、蜡螟、黄地老虎均以人工饲料在28℃饲养。

3. 肠道蛋白酶粗提物的制备　轻压5龄或6龄初粘虫的腹部，在冰浴中收集其返吐物，以15,000转/分离心去沉淀，上清液在0℃保存备用。棉铃虫、蜡螟和黄地老虎的返吐

本文于1980年9月收到。

表1　菌 株 及 来 源

菌　号	菌　　名		血清型	来　　源
7404	肯尼亚变种	*B. t.* var. *kenyae*	H_{4a-4c}	本所分离
HD-1	戈尔斯德变种	*B. t.* var. *kurstaki*	H_{3a-3b}	美国引进
7216	天门变种	*B. t.* var. *tianmensis**	H_{3a-3b}	湖北天门县微生物研究所
75023	变种未定	*B. thuringiensis*	H_3	湖北天门县微生物研究所
007	苏芸金变种	*B. t.* var. *thuringiensis*	H_1	本所分离
7417	松蠋变种	*B. t.* var. *dendrolimus*	H_{4a-4b}	东北农学院
006	玉米螟变种	*B. t.* var. *ostriniae***	H_8	本所分离
1897	以色列变种	*B. t.* var. *israelensis*	H_{14}	捷克引进

* 湖北省天门县微生物研究所 (1980)　** 任改新等 (1975)

物太少，则需解剖其5龄幼虫取围食膜及内含物，加0.05M pH9.7的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液研磨后，以15，000转/分离心去沉淀，上清液在0℃保存备用。粘虫返吐液的pH为9.26（以Copenhagen PHM 84 pH计测定），其它3种以石蕊试纸测试，蜡螟中肠的pH在8.0—9.0之间，黄地老虎及棉铃虫中肠的pH均在8.5—10.0之间。

4. 晶体对粘虫的毒效测定　称取一定量的纯晶体，加入重蒸馏水研磨，超声波振荡2分钟使晶体均匀悬浮，然后稀释至2，000和4，000倍，各加微量Triton X-100，以蒸馏水加微量Triton X-100为对照。新鲜玉米叶浸于上述悬液中，待干后饲喂3龄末或4龄初粘虫，观察72小时，计算死亡数。

5. 晶体消化液的制备　称取1毫克纯晶体，以0.05M pH9.7的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液悬浮并经超声波振荡2分钟，然后加入肠道蛋白酶粗提物，30℃培育6小时。加酶量以电泳时不出现酶蛋白带为适度。

6. 以相差显微镜和日立HU-11A电子显微镜观察晶体经肠道蛋白酶培育后的变化，并根据莽克强等（1975）的方法以聚丙烯酰胺凝胶电泳检验。

7. 不同菌株的晶体悬液加入粘虫肠道蛋白酶后置30℃培育，直接观察混浊度的变化，并在不同时间取出悬液，稀释20倍在721分光光度计上以680毫微米波长测光密度的变化。

结 果 与 讨 论

1. 8个不同变种的纯晶体对粘虫的毒效测定见表2。72小时的死亡率以HD-1为最高，7404次之，7417的毒力极低，006和1897对粘虫则无毒效。在有毒效的试虫组中，拒食现象十分明显，24小时内试虫取食极微，虫体未见生长，行动迟缓，48小时为死亡高峰。

2. 晶体被肠道蛋白酶消化过程中的变化　4种昆虫肠道蛋白酶对各种晶体进行消化时，2小时后HD-1与007的晶体悬液已有变化，及至6小时HD-1的悬液几乎澄清了，而007的混浊度明显降低，其它菌株则无明显变化。图1中可见HD-1曲线急剧下降，6小时后其光密度值仅为原有的15%，007的光密度值亦下降至原有的55%，这与外观混浊度的变化十分吻合。Lecadet等（1967）以菜青虫肠道蛋白酶消化苏芸金变种的晶体时

表 2 苏芸金杆菌晶体对粘虫的毒效测定

菌 种	稀释倍数	试虫数(头)	72 小时		死亡率(%)
			死虫(头)	活虫(头)	
HD-1	2000	60	56	4	93
	4000	60	41	19	68
7404	2000	60	45	15	75
	4000	60	22	38	37
75023	2000	60	44	16	73
	4000	60	20	40	33
7216	2000	60	38	22	63
	4000	60	10	50	17
007	2000	60	9	51	15
	4000	60	2	58	3
7417	2000	60	5	55	8
1897	2000	60	2	58	3
006	2000	58	0	58	0
对照(水)		60	1	59	2

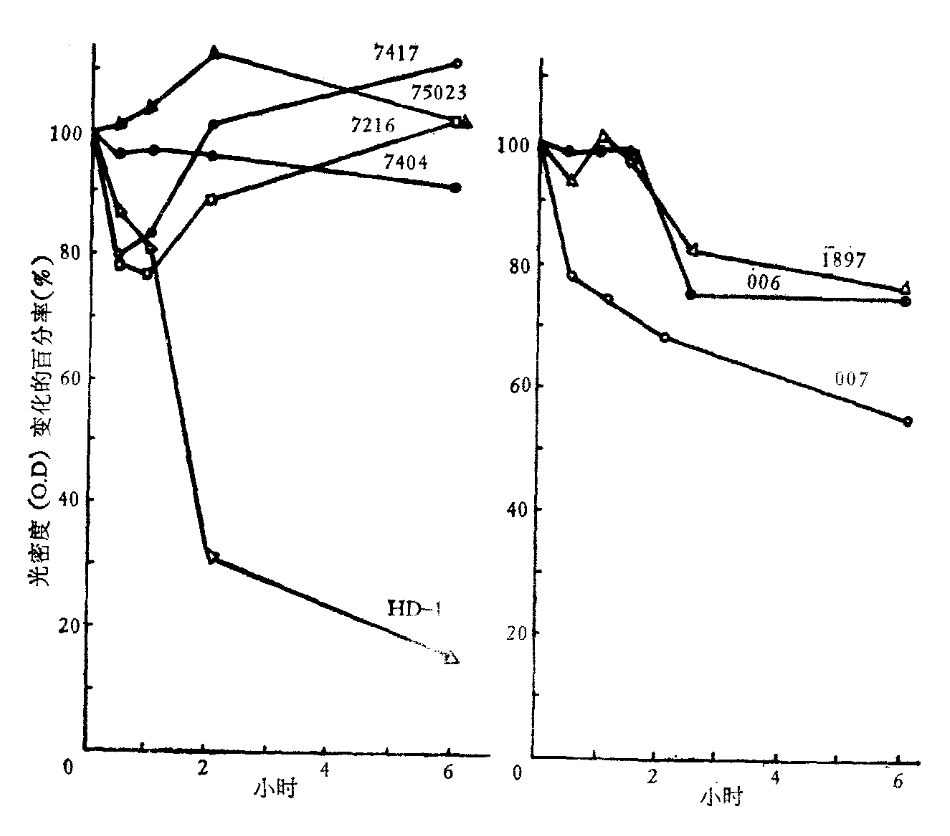


图 1 不同晶体被粘虫肠道蛋白酶消化后光密度的变化。30℃温培，不同时间取样测光密度

报道了光密度降低现象，并认为与蛋白质被消化紧密相关。1897、006 的光密度值下降至 75% 左右，7404 下降至 90%，而 7216、7417、75023 的光密度反而增高。上述现象可能与消化程度的差异和某些晶体在碱性溶液中膨胀有关，这种光密度的变化与毒力不成正相关。

晶体与肠道蛋白酶培育 6 小时后，在相差显微镜下可明显地看到不同品系晶体有不同的变化。HD-1 晶体大量减少，每个视野仅能看到 5—20 个不等的较完整的晶体夹杂着小碎片，这说明大部分晶体已被消化，与晶体悬液变透明和光密度降低十分一致。图版 I:4 所见 HD-1 的较完整晶体在电镜下很难找到，外形已有变化，还可见许多小碎片。007 晶体亦显著减少，虽尚完整但外形不清晰，部分锐角变钝并有碎片(图版 I:8)。7404 晶体锐角显著变钝，并可见晶体上有缺口(图版 I:3)。7417 晶体棱角清楚，外形无明显变化(图版 I:5)，说明粘虫肠道蛋白酶对它作用极微。7216、75023 晶体的锐角变钝，电镜照片中还可见碎小颗粒(图版 I:1 图版 I:6)。006 晶体的形状原来就不规则，因而看不出明显的变化，但较原来更接近圆形，照片中可见许多细小颗粒(图版 I:2)。1897 晶体棱角变圆并有分散的碎片(图版 I:7)。从电镜观察晶体外形，变化最大的是 HD-1 晶体，大部分已完全解体，少数尚存碎片。变化最小的是 7417 晶体。

3. 晶体消化物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱　晶体被昆虫肠道蛋白酶消化后混浊度不一，说明晶体的结构不同和蛋白酶对晶体切割的程度和方式亦有区别。4 种鳞翅目幼虫肠道蛋白酶对每种晶体作用后，它们的蛋白带位置十分相似，染色上的深浅表明了蛋白量的差异。

图版 II:1 中的 A、B、C、D、E、F、G、H 是粘虫肠道蛋白酶作用于 8 种晶体的电泳图谱。7404、7216、75023 的蛋白带图谱和位置十分相似，对粘虫的毒效也比较接近。HD-1 的蛋白带较宽，蛋白量明显地较多，对粘虫的毒力也高。007 的蛋白带虽宽但毒力不高。006、7417 的蛋白带染色极浅，对粘虫的毒力极低或无毒。1897 有其独特的电泳图谱，蛋白带多而分散，对粘虫几乎无毒性。可以认为一定位置的蛋白带即一定分子量的特定的一个或几个蛋白质才对粘虫有毒力。1897 虽能被粘虫肠道蛋白酶消化，但其消化产物对粘虫无毒效。因而晶体对昆虫是否有毒性，除蛋白酶这一主要因素外还依赖于晶体和寄主双方的其它因素。

图版 II:2 A、B、C、D 为 7216 晶体被 4 种昆虫肠道蛋白酶消化后的电泳图谱。5 条蛋白带的位置相似，但染色有区别。粘虫的电泳图谱 3 条主带染色一致，棉铃虫的电泳图谱 2 条蛋白带染色深，中间一条染色浅，黄地老虎的电泳图谱 2 条染色浅，第三条染色深，蜡螟的电泳图谱中第一条染色深而其它两条染色浅。这种现象说明晶体受酶作用的部位是一定的，但由于酶之间的差别而作用程度不同，因而显出了染色深浅的不同。其它晶体被这 4 种鳞翅目幼虫肠道蛋白酶消化后的电泳图谱亦相似，也有蛋白带染色深浅的区分。

为了解缓冲液在消化晶体中的作用，以 0.05M pH9.7 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液与各晶体在 30℃ 培育 6 小时后进行电泳。除 1897 晶体出现蛋白带外（但与酶消化后的不同)，其它晶体均未出现。Faust 等 (1967) 认为 0.05M pH9.5 的碳酸钠缓冲液足以溶解部分晶体的论点要因晶体而异。值得提出的是 1897 晶体的重蒸馏水 (pH 为 6)悬液在 30℃ 培育 6 小时后，电泳时也出现蛋白带(以超声波处理与不处理的结果一样，见图版 II:3 的

a, b, c), 说明 1897 晶体有特异性。

晶体中会混杂极少数芽孢，为免除它们受肠道蛋白酶的作用而影响对晶体蛋白消化物的电泳分析，我们以纯芽孢按晶体一样处理，但电泳后未出现任何蛋白带，可以认为肠道蛋白酶对芽孢无作用或作用极微。

小 结

苏芸金杆菌晶体对寄主的致病作用与双方的生物化学特性和生理特性紧密相关。现就本试验作如下小结。

1. 苏芸金杆菌不同品系的晶体受昆虫肠道蛋白酶作用后有其各自的电泳图谱。同一晶体在不同寄主肠道蛋白酶作用下，其电泳图谱基本相同，推测每种晶体具有自己特定的酶作用部位。

2. 对粘虫而言，晶体的肠道蛋白酶消化产物只有在一定分子量范围内才有毒性。

3. 非敏感昆虫的肠道蛋白酶虽亦能消化晶体，但其消化产物对寄主无毒性。

4. 1897 晶体较其它晶体有特异性。

5. 试验中的 4 种鳞翅目幼虫肠道蛋白酶就消化晶体看有相似之处。

参 考 文 献

莽克强等 1975 聚丙烯酰胺凝胶电泳。科学出版社。

任改新等 1975 昆虫病原菌苏芸金芽孢杆菌群 (*B. thuringensis* group) 的分类。微生物学报 **15**(4):292—301。

湖北省天门县微生物研究所 1980 苏芸金杆菌天门变种——“7216”菌的研究。微生物学报 **20**(1): 1—5 。

王瑛等 1980 苏芸金杆菌晶体与芽孢分离的研究。微生物学报 **20**(3): 285—8。

Angus, T. A. 1956 Extraction, purification and properties of *Bacillus sotto* toxin. *Can. J. Microbiol* **2**: 416—26.

Cooksey, K. E. 1968 Purification of a protein from *B. thuringiensis* toxin to larvae of Lepidoptera. *Biochem. J.* **106**: 445—54.

Faust. R. M. et al. 1967 Dissolution of the toxic parasporal crystals from *B. thuringiensis* var. *pacificus* by the gut secretion of the silk-worm *Bombyx mori*. *J. Invert. pathol.* **9**(4): 488—99.

Lecadet, M. M. and R. Dedonder 1967 Enzymatic hydrolysis of the crystals of *B. thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae*. I. Preparation and fractionation of the lysates. *J. Invert. pathol.* **9**(3): 310—21.

Lecadet, M. M. and D. Martouret 1962 La toxine figuree de *B. thuringiensis*. Production enzymatique de substances solubles toxiques par injection. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **254**: 3457—9.

Murphy, D. W. 1974 Function of midgut proteases in influencing susceptibility of insect larvae to the delta-endotoxin of *B. t.* var *thuringiensis*. Dissertation Abstracts International **34**(12), part I 6039-B.

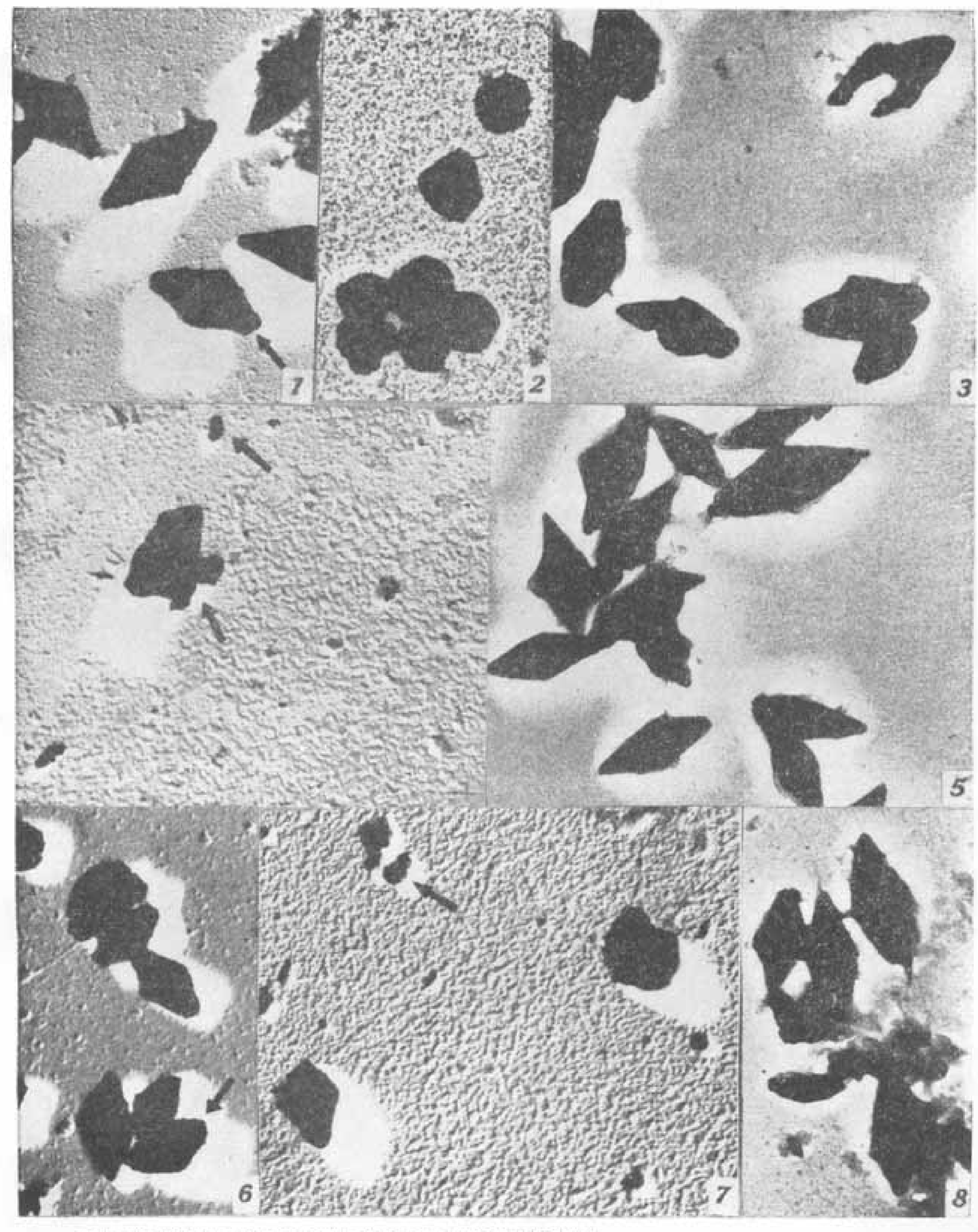
Pendleton, I. R. 1966 Separation of the spores and crystals of *B. thuringiensis*. *Nature*. **212**(5063): 728—9.

COMPARISON OF THE EFFECTS OF INSECT INTESTINAL PROTEASES ON THE CRYSTALS OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

SHA CHA-YUN & BAI CHEN

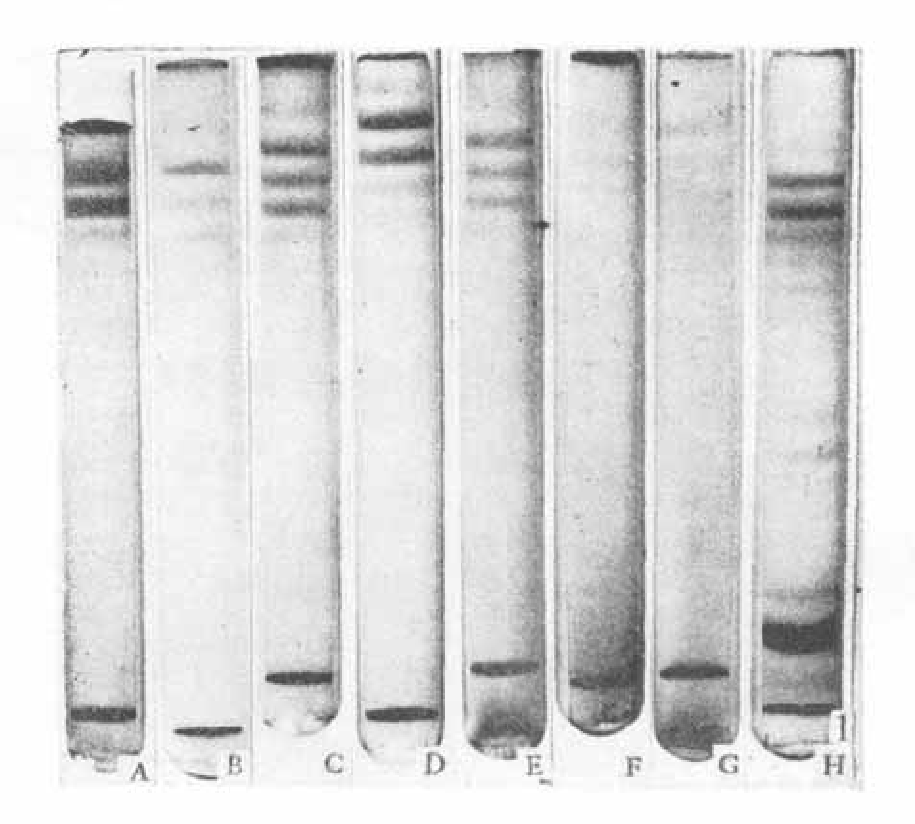
(Institute of Zoology, Academia Sinica)

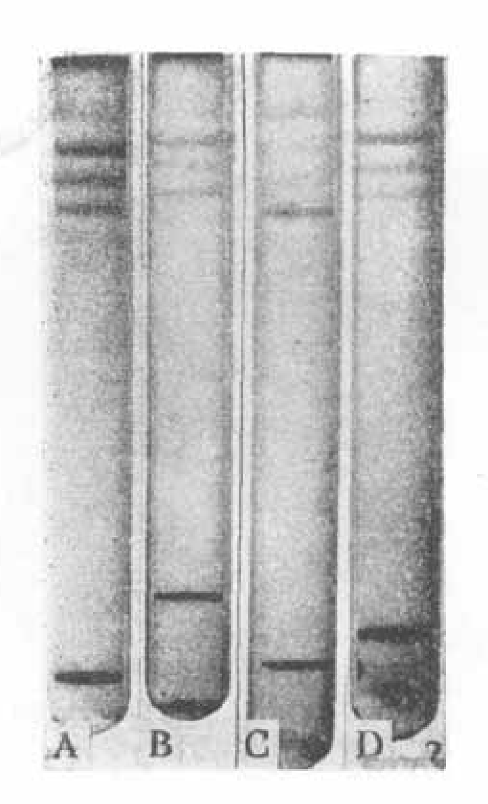
This paper deals with the effects of intestinal proteases of the army-worm *Leucania separata,* the cotton bollworm *Heliothis armigera,* the great wax moth *Galleria mellonella* and the cut-worm *Agrotis* segetum on the crystals of *Bacillus thuringiensis* 7404 (var. *kenyae*),HD-1 (var. *kurstaki*), 7216 (var. *tianmensis*), 75023 (H_8), 007 (var. *thuringiensis*), 006 (var. *ostriniae*), 7417 (var. *dendrolimus*) and 1897 (var. *israelensis*). HD-1 crystals are most quickly digested by insect proteases; the suspension was almost transparent after 6 hours of incubation. Examination with phase contrast microscope showed that most of the crystals were completely digested and only 5 to 20 crystal remained in the field of examination. The partially digested crystals were examined under electronmicroscope and the change in optical density of the digested suspensions was recorded. Electrophoretic patterns of the hydrolysates of the crystals from different sources were compared and each of them showed its own electrophoretogram. Crystals of non-pathogenic strains were also digested by the proteases but the hydrolysates were not toxic to the insect of concern. The crystals from the strain 1897 showed protein bands in the elecrtophoretogram after in the suspension in double distilled water incubated for 6 hours at 30°C.

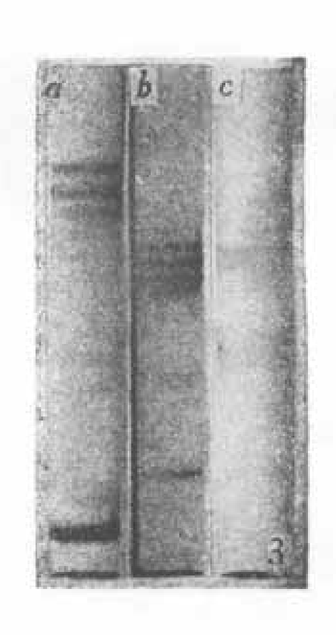


不同晶体被粘虫肠道蛋白酶消化后的电子显微镜观察铂铱投影

1. 7216 箭头示晶体的锐角已变钝（×27500）
2. 006 晶体形状无显著变化（×22500）
3. 7404 箭头示晶体消化后出现缺口，形态已缺损（×17500）
4. HD-1 箭头示极少数尚完整的晶体和许多碎片（×17500）
5. 7417 晶体形态完整，变化甚微（×20000）
6. 75023 箭头示晶体消化后的钝角（×17500）
7. 1897 箭头示晶体消化后的碎片（×27500）







1. 不同品系的晶体被粘虫肠道蛋白酶消化后的电泳图谱，7.5%凝液。

   A. HD-1　B. 7404　C. 7216　D. 007　E. 75023　F. 7417　G. 006　H. 1897。 A—E 对粘虫有不同程度的毒效 F—H 对粘虫无毒效。

2. 7216 晶体被不同寄主肠道蛋白酶消化后的电泳图谱，7.5% 凝胶。

   A. 粘虫 B. 棉铃虫 C. 黄地老虎 D. 蜡螟。电泳图谱很相似，但三条主带染色上有差别。

3. 1897 晶体在不同溶液中的电泳图谱，7.5% 凝胶。

   a. 粘虫肠道蛋白酶和缓冲液 b. 缓冲液 c. 重蒸馏水。